

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход
ДОКУМЕНТ
в начало
в конец
печать
ТЕРМИНЫ
предыдущий
следующий

Реферат

Статус по данным на 24.01.2007 - прекратил действие

2024021

C1

1994.11.30

RU

4934091/14

1991.05.05

1994.11.30

5

G01N33/52 МПК

METHOD OF TUBERCULOSIS DIAGNOSIS

Nauchno-issledovatel'skij institut khirurgii

Vostochno- Sibirskogo filiala SO RAMN

Majakova T.I.

Pljusnin S.A.

Kovaleva M.G.

Nauchno-issledovatel'skij institut khirurgii

Vostochno- Sibirskogo filiala SO RAMN

Реферат

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход

[Библиография](#)**№2024021. Реферат**

FIELD: medicine. SUBSTANCE: method involves sputum sample taking off, its autoclaving, extraction with chloroform-methanol mixture, evaporation, methylation, dissolving in hexene following by chromatomass-spectrometric assay of tuberculostearic acid. Method involves also separation of organic layer after extraction with chloroform-methanol mixture, its drying over anhydrous sodium sulfate and methylation at the methylating mixture boiling point for 15-20 min. EFFECT: simplified method, shortened time of assay.

[Библиография](#)

ДОКУМЕНТ
в начало
в конец
печать

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ
СОБСТВЕННОСТИ**

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход

У Вас осталось
462 запроса
(0 у.е.)
(4624 руб.)

Статус	извещения к данному документу по данным на 24.01.2007 - прекратил действие
(11) Номер публикации	2024021
(13) Вид документа	C1
(14) Дата публикации	1994.11.30
(19) Страна публикации	RU
(21) Регистрационный номер заявки	4934091/14
(22) Дата подачи заявки	1991.05.05
(45) Опубликовано	1994.11.30
(516) Номер редакции МПК	5
(51) Основной индекс МПК	G01N33/52
Название	СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА
(56) Аналоги изобретения	Y. Clin. Ynvestig., 1979, V.63, N 5, P.813-819.
(71) Имя заявителя	Научно-исследовательский институт хирургии Восточно- Сибирского филиала СО РАМН
(72) Имя изобретателя	Маякова Т.И.
(72) Имя изобретателя	Плюснин С.А.
(72) Имя изобретателя	Ковалева М.Г.
(73) Имя патентообладателя	Научно-исследовательский институт хирургии Восточно- Сибирского филиала СО РАМН

ИЗВЕЩЕНИЯ К ПАТЕНТУ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

Код изменения правового статуса	ММ4А - Досрочное прекращение действия патентов РФ из-за неуплаты в установленный срок пошлин за поддержание патента в силе
Дата публикации бюллетеня	2000.09.27
Номер бюллетеня	27/2000

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ
СОБСТВЕННОСТИ**

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход

У Вас осталось
462 запроса
(0 у.е.)
(4624 руб.)

№2024021. Реферат

Использование: медицина, пульмонология. Цель - сокращение времени определения и упрощение способа. Сущность изобретения: забор пробы мокроты, ее автоклавирование, экстракция хлороформ-метанольной смесью, упаривание, метилирование, растворение в гексене и последующее хроматомасс-спектрометрическое определение туберкулостеариновой кислоты. Отличие способа заключается в отделении органического слоя после экстракции хлороформ-метанольной смесью, в высушивании его над безводным сульфатом натрия и проведение процесса метилирования при температуре кипения метилирующей смеси в течение 15 - 20 мин.

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ
СОБСТВЕННОСТИ**

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход

У Вас осталось
462 запроса
(0 у.е.)
(4624 руб.)

№2024021. Описание

Изобретение относится к медицине, а именно к бактериологии, и может быть использовано для идентификации микробактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*).

Известны различные способы диагностики туберкулеза, включающие выявление микробактерий туберкулеза (МБТ) в патологическом материале.

Известен способ обнаружения МБТ путем прямой бактериоскопии (см. Перельман М. И. , Корякин В.А. и Протопопова И.М.

Туберкулез. М.: Медицина, с. 32-33). Для этого на обезжиренное стекло наносят каплю физиор раствора и мокроту больного, которые тщательно растирают до однородности. Высушивают, фиксируют спиртом и красят фуксином Циля-Нильсена. Препарат микроскопируют. МБТ окрашиваются в красный цвет, а окружающий фон - в синий.

Также известен и бактериологический способ диагностики туберкулеза, включающий посев исследуемого материала на питательную среду Левенштейна-Йенсена. Культивирование проводят в течение 14-90 дней (см. Перельман М.И., Карякин В.А. и Протопопова И.М. Туберкулез. М.: Медицина, с. 32-33). Затем культуру пересевают на глицериновые среды, инкубируют с последующей обработкой кислотами и щелочами. В заключение

проводят пробу на устойчивость - мазки опускают в растворы: 1 - серной кислоты, 2 - едкого калия (натрия), 3 - жавелевой воды. После чего мазки докрашивают и микроскопируют.

По наличию в микроскопической картине бесцветных продолговатых и морщинистых палочек микобактерий туберкулеза диагностируют туберкулез.

К недостаткам данных способов следует отнести низкую чувствительность методов и длительные сроки постановки диагноза, обусловленные культивированием бактерий.

Наиболее близкими по технической сущности к предлагаемому является способ диагностики туберкулеза путем обнаружения туберкулостеариновой кислоты, являющейся биомаркером микобактерий туберкулеза (J, Clin. Investig., v. 63, N 5, 1979, p. 813-819).

Известный способ осуществляют следующим образом. 2-4 мл мокроты больного обеззараживают автоклавированием (при 121°C в течение 60 мин при Р = 1,1 кр/см²), обрабатывают 5 мл 3%-ного водного раствора лаурилсульфата и 1%-ным раствором гидроксида натрия при перемешивании в течение 20 мин. Полученную смесь центрифицируют при 3 тыс. оборотов в мин в течение 30 мин, pH раствора доводят серной кислотой до 7,0 и лиофилизируют. Затем образцы переносят в 2-миллилитровую стеклянную ампулу и экстрагируют в течение ночи смесью хлороформ - метанол (2 : 1, V/V) при комнатной температуре. После центрифугирования в течение 20 мин при

4000 об/мин супернатант переносят в новую ампулу и концентрируют досуха в токе азота. После чего приливают 1 мл 3%-ного метанольного раствора хлористого водорода и ампулу запаивают. Метанолиз проходит при 80°C в течение 20 ч, по окончании ампулу центрифугируют при 4000 об/мин 20 мин. Супернатант упаривают досуха в токе азота и добавляют 100 мл н-гексана. Полученную смесь обрабатывают в ультрасониковой бане 1 мин при 125 В, затем раствор анализируют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Условия ТСХ: пластины приготавливают нанесением слоя 0,25 мм силикагеля (Silicagel Go F 254, Merck A.G., Darmstadt, Germany). В качестве растворителя используют смесь н-гексана и диэтилового эфира (9 : 1). Через 30-40 мин пятно, соответствующее метиловому эфиру, соскабливают с пластины и экстрагируют этилацетатом. Перед инжекцией в газохроматографическую колонку образец был упарен досуха и растворен в гексане.

Образец снимали на приборе: масс-спектрометр (Varian Assaciatis, Instrument Dis, Palo Alto, Calif, MaT model 112), соединенный с газовым хроматографом (Varian Associates, model 112).

Условия хроматографирования следующие: стеклянная колонка, вн. диаметр 2 мм, заполненная 3,7% ОУ-17 на хромосорбе W, HP 80/100 меш, длина колонки - 3 м. Температура инжектора - 270°C, температура печи - 230°C. Газ-носитель - гелий, его скорость - 20 мл/мин. Условия работы масс-спектрометра следующие.

Температура сепаратора - 250°С, температура ионного источника - 230°С, энергия электронов 70 еВ. Измерение проводили при детектировании по одному иону, соответственно по 312 m/z (молекулярный ион) и по 167 m/z. По наличию в полученном масс-спектре характерного молекулярного иона туберкулостеариновой кислоты диагностируют туберкулез. Общее время анализа составляет 4 сут. К недостаткам данного способа следует отнести длительность и многоэтапность операций, предшествующих хромато-масс-спектрометрическому исследованию пробы.

Целью предлагаемого способа диагностики является сокращение времени определения и упрощение способа.

Поставленная цель достигается тем, что способ диагностики туберкулеза проводят путем забора пробы, ее автоклавирования, экстракции хлороформ-метанольной смесью, упаривания, метилирования, растворения в гексане и хромато-масс-спектрометрического определения туберкулостеариновой кислоты.

Сопоставительный анализ с прототипом показывает, что отличительными признаками заявляемого способа являются: отделение органического слоя после проведения экстракции, его высушивание над безводным сульфатом натрия и проведение метилирования при температуре кипения метилирующей смеси в течение 15-20 мин.

Эти отличия позволяют сделать вывод о соответствии заявляемого технического решения критерию изобретения

"новизна".

Сравнение заявляемого решения с другими техническими решениями показывает, что прием отделения органического слоя от водной фазы образца является широко используемым в органической химии, так же как и удаление следов воды из органического экстракта с помощью безводной соли Na_2SO_4 . Однако указанные приемы не использовались ранее для подготовки безводного образца к хромато-масс-спектрометрическому анализу. Введение данных приемов в заявленный способ позволило исключить технически сложный прием - лиофильную сушку биосубстрата и тем самым сократить общее время анализа на 4-6 ч.

Авторами заявляемого способа экспериментальным путем установлено, что в предлагаемом способе процесс метилирования происходит за 15-20 мин. Необходимым условием является проведение этой реакции при температуре кипения метилирующей смеси ($t = 65\text{-}70^\circ\text{C}$) в колбе с обратным холодильником. Данный прием позволяет сократить время диагностики на сутки, поскольку в известном способе процесс метилирования идет в течение 20 ч (при $t = 80^\circ\text{C}$).

Таким образом, авторами заявляемого способа диагностики установлено новое свойство анализируемой смеси - процесс метилирования происходит за 15-20 мин, что позволяет сделать вывод о соответствии технического решения критерию "существенные отличия".

Заявленный способ диагностики туберкулеза осуществляют следующим образом.

Для анализа забирают от 2 до 10 мг биосубстрата-мокроты, содержимого плевральной полости или дренажной жидкости.

Биосубстрат автоклавируют при температуре 121°C в течение 60 мин, к нему добавляют 5 мл гидроксида натрия (4%), встряхивают 10 мин, нейтрализуют разбавленной H₂SO₄ до pH 7,0 и заливают экстрагирующей смесью - хлороформ : метанол, взятых в соотношении 2 : 1. Соотношение биосубстрата и экстрагента составляет 1 : 1. Экстракцию проводят при комнатной температуре в течение 20 ч. Затем смесь центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, отделяют нижний органический слой, который высушивают над Na₂SO₄(безводным). После чего экстракт отфильтровывают от Na₂SO₄ и упаривают досуха в токе азота.

Остаток метилируют в 3%-ном растворе HCl в метаноле при температуре кипения 65-70°C в течение 15-20 мин. Затем раствор упаривают в токе азота, остаток растворяют в 10 мл гексана и анализируют на хромато-масс-спектрометре (ХМС) методом селективного ионного детектирования (SIM) при m/z 312 и записи полного масс-спектра метилата C₁₉ кислоты. Основные фрагментарные ионы масс-спектра туберкулостеариновой (TbS) кислоты: (m/z) 312, 269, 199, 171, 167, 149, 141, 113.

ХМС-анализ выполняют на приборе хромато-масс-спектрометре фирмы LKB 20-91 с ЭВМ РДП1134. Условия хроматографирования: стеклянная капиллярная колонка (l = 25) с

неподвижной жидккой фазой SE-30; температура инжектора - 350°C; температура термостата - 140 ->> 320°C, 4'/мин; газ-носитель - He, V_{He} - 20 мл/мин.

Условия снятия масс-спектра: температура сепаратора - 320°C; температура ионного источника - 320°C; энергия ионизирующих электронов - 70 еВ. Ионный ток записывали по одному иону - m/z 312, т.е. в режиме селективного ионного детектирования.

Минимальная определяемая концентрация TbS кислоты в образце составляла 100 мг/мл. Общее время анализа занимало 2 сут.

П р и м ер 1. Взята на исследование мокрота от больного Г., поступившего в гнойное отделение центра хирургической инфекции с предварительным диагнозом - гангрена легкого (N истории болезни 5850, дата взятия анализа 20.12.90). 10 мл мокроты автоклавировали при 121°C 30 мин, P = 1,1 кР/см². К обеззараженному биосубстрату добавили 5 мл 4%-ного раствора NaOH, содержимое встряхивали в течение 10 мин, затем нейтрализовали разбавленной H₂SO₄ до pH 7,0 и заливали экстрагентом хлороформ-метанол (2 : 1) в количестве 15 мл и оставляли на ночь при комнатной температуре. После центрифугирования отделяли нижний органический слой и высушивали его над безводным Na₂SO₄ в течение 20 мин. Отфильтровывали экстракт от Na₂SO₄ и упаривали досуха в токе азота. Сухой остаток метилировали 3%-ным раствором соляной кислоты в метаноле, приготовленном добавлением 5 мл

хлористого ацетила к 100 мл сухого MeOH. Метилирование проводили десятью мл метилирующего агента при нагревании до температуры кипения (с обратным холодильником) в течение 15 мин. Метилированный продукт упаривали в токе азота досуха, остаток растворяли в 100 мкл гексана и анализировали на хромато-масс-спектрометре фирмы IKB 2091 с ЭВМ РДП-1134 с использованием стеклянной капиллярной колонки $l = 25$ м с неподвижной жидкой фазой SE-30. Хроматографирование проводили при температуре $140\text{--}320^{\circ}\text{C}$, $4^{\circ}/\text{мин}$; газ-носитель He; температура инжектора - 350°C ; температура ионного источника - 320°C ; температура сепаратора - 320°C ; энергия ионизирующих электронов - 70 eV. Запись масс-спектра TBS кислоты вели при максимальной интенсивности 1357. В результате проведенного анализа установлено присутствие туберкулостеариновой кислоты в образце.

П р и м ер 2. Проведен забор мокроты от больного С. с предварительным диагнозом двухсторонняя абсцедирующая пневмония (N истории болезни 1899). 10 мл мокроты автоклавировали (121°C , 30 мин, $P = 1,1 \text{ кр}/\text{см}^2$) с добавлением к ней 5 мл 4%-ного водного раствора NaOH, содержимое встряхивали 10 мин, раствор нейтрализовали разбавленной H_2SO_4 до $\text{pH} 7,0$ и заливали экстрагентом хлороформ-метанол (2 : 1, V/V) в количестве 15 мл и оставляли на ночь при комнатной температуре. После центрифугирования отделяли нижний органический слой и высушивали его над 15 г безводной NaSO_4 в

течение 20 мин. Экстракт отфильтровывали и упаривали досуха в токе азота. Сухой остаток метилировали 3%-ным раствором HCl в метаноле. Метилирование проводили 10 мл метилирующего агента при нагревании до температуры кипения (с обратным холодильником) в течение 20 мин. Прометилированный продукт упаривали в токе азота досуха, остаток растворяли в 100 мкл гексана и анализировали на хромато-масс-спектрометре (условия ХМС-анализа приведены выше). Запись масс-спектра в интервале выхода TbS кислоты проводили при интенсивности 2857. Туберкулостеариновой кислоты не обнаружено.

Из представленных материалов следует, что заявленный способ позволяет в 2 раза сократить общее время проведения анализа (2 сут вместе 4 по способу-прототипу) и значительно упростить его за счет исключения приемов лиофилизации. Для наглядного выявления различий сравниваемых технических решений приведен их сопоставительный анализ:

Известный способ 1. Взятие биопробы (мокрота) 2.
Автоклавирование пробы при 121°C в течение 60 мин 3.
Обработка 3%-ным водным раствором лаурилсульфата и 1% -
ным водным раствором гидроксида натрия при перемешивании в
течение 20 мин 4. Центрифугирование при 3 тыс. об. в мин в
течение 30 мин. 5. Доведение pH до 7,0 (с использованием
серной кислоты) 6. Лиофилизация 7. Экстракция смесью
хлороформ - метанол (1 : 1) в течение 20 ч 8. Центрифугирование

при 4 тыс. об. в мин в течение 20 мин 9. Концентрация в токе азота (досуха) 10. Добавление 1 мл 3%-ного метанольного раствора кислоты 11. Метанолиз при 80°C в течение 20 ч 12. Центрифугирование при 4 тыс. об. в мин в течение 20 мин 13. Упаривание супернатанта в токе азота 14. Добавление 100 мл н-гексана 15. Обработка смеси в ультрасониковой бане в течение 1 мин при 125 В 16. Анализ методом тонкослойной хроматографии на силикагеле, элюент н-гексан - диэтиловый эфир (9 : 1) 17. Соскабливание пятна через 30-40 мин, соответствующего метиловому эфиру и экстрагирования его этилацетатом 18. Упаривание досуха 19. Растворение в гексане 20. Анализ на хромато-масс-спектрометре 21. Условия хроматографирования: стеклянная колонка, $l = 3$ м, внутренний $d = 2$ мм, заполненная 3,7% ОУ-17 на хромосорбе WHP 80/100 меш,

t инжектора = 270°C.

t термостата = 230°C,

газ-носитель - гелий,

$V_{He} = 20$ мл/мин 22. Условия работы масс-спектрометра:

t сепаратора = 250°C,

t ионного источника = 230°C,

$E = 70$ эВ, измерение проводили при селективном детектировании по ионам m/z 312 и 167.

Общее время анализа - 4 сут

Заявляемый способ 1. + 2. + 3. Обработка 4%-ным водным раствором гидроксида натрия, встряхивание в течение 10 мин 4. - 5. + 6. - 7. +, соотношение растворителей 2 : 1, соотношение экстракта и экстрагента 1 : 1, + 8. +, при 3 тыс. об. в мин в течение 15 мин, отделение нижнего органического слоя, его высушивание над безводным сульфатом натрия, фильтрование 9. + 10. + 11. +, при 65-70°C в течение 15-20 мин 12. - 13. + 14. +, 10 мл н-гексана 15. - 16. - 17. - 18. - 19. - 20. + 21. Условия хроматографирования: стеклянная капиллярная колонка, $l = 25$ м, заполненная 5% SE-30 на хромосорбе,

t инжектора 350°C,

t термостата 140-320°C, 4°/мин,

газ-носитель - гелий,

$V_{He} = 20$ мл/мин 22. Условия работы масс-спектрометра:

t сепаратора = 320°C,

t ионного источника = 320°C

E = 70 эВ, измерение проводили при селективном ионном детектировании по иону m/z 312.

Общее время анализа - 2 сут

Основными отличительными приемами заявленного способа/ обеспечивающими движение поставленной цели/ являются высушивание органического слоя над безводным сульфатом натрия и проведение процесса метилирования в течение 15-20 мин при 65-70°C.

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ
СОБСТВЕННОСТИ**

- [Выбор баз данных](#)
- [Параметры поиска](#)
- [Формулировка запроса](#)
- [Уточненный запрос](#)
- [Найденные документы](#)
- [Корзина](#)
- [Сохраненные запросы](#)
- [Статистика](#)
- [Помощь](#)
- [Предложения](#)
- [Выход](#)

У Вас осталось
462 запроса
(0 у.е.)
(4624 руб.)

№2024021. Формула

СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА, включающий взятие пробы мокроты, автоклавирование пробы при 121°С в течение 60 мин при давлении 1,1 кр/см², экстракцию хлороформ-метанольной смесью, взятой в соотношении 2 : 1, центрифугирование, упаривание супернатанта в токе азота, добавление к высушенному супернатанту 3%-ного метанольного раствора хлористого водорода и инкубацию полученной смеси при 80°С, повторное центрифугирование и упаривание супернатанта, растворение последнего в гексане с последующим определением туберкулостеариновой кислоты хроматографическим и массспектрометрическим методами, отличающийся тем, что, с целью ускорения и упрощения способа, органический слой отделяют после центрифугирования и перед упариванием его высушивают над безводным сульфатом натрия, а инкубацию проводят при 65 - 70°С в течение 15 - 20 мин.